

实验技术

一种简便的环核苷酸磷酸二酯酶活性测定法——纸电泳分离水解产物

贺师鹏 魏莫愁

(北京医学院生物物理教研组)

在环核苷酸磷酸二酯酶(PDE)活性测定方法中,使用最广泛的是由 Butcher 和 Sutherland^[1] 建立并经 Thompson 和 Appleman^[2] 改进的方法,即



反应混合物用阴离子交换法将 $^3\text{H-cAMP}$ 和 $^3\text{H-腺苷}$ 分开。Thompson 和 Appleman, 将阴离子交换树脂 (Dowex1-x2) 直接加入反应混合物中,离心后取上清液测量其放射性,此法称为“Batch”技术。优点是步骤简便、迅速。缺点是分离不完全,会造成一定误差。后来大家都改用离子交换柱层析方法^[3],以蒸馏洗脱 $^3\text{H-腺苷}$,而 $^3\text{H-cAMP}$ 仍留在柱上。

最近发现,在某些粗制的 PDE 制剂中可能存在脱氨酶,它可使腺苷进一步转化成次黄嘌呤核苷,如果用蒸馏水洗脱,次黄嘌呤核苷将留在柱上,而造成误差^[4]。

本文摸索用纸电泳法分离环核苷酸及其水解产物,并直接以纸片法测量放射性的 PDE 活性。如果酶制剂中存在脱氨酶,由它生成的次黄嘌呤核苷在纸电泳分离后的位置和腺苷相邻,可以作为同一个产物来测定,从而避免了误差。

一、材料与方 法

1. 药品 $^3\text{H-cAMP}$ 比活性 21 居里/mM, $^3\text{H-5'}$, AMP 比活性 15 居里/mM (上海原子核所), $^3\text{H-cGMP}$ 比活性 15 居里/mM (北京原子能所), cAMP、cGMP、5'-AMP, 腺苷, 黄岑

总黄酮 (北京医学院药系), 蛇毒: 眼镜王蛇 (广西医学院生化教研组), 阴离子交换树脂 (Dowex1-x2) (100—200 目), Whatman 1[#] 层析纸。

2. 试剂 (1) A 缓冲溶液 50mM. pH7.5 Tris-HCl (内含 4.0mM α -巯基乙醇), B 缓冲溶液: 50mM. pH7.5, Tris-HCl (内含 4.0mM α -巯基乙醇, 5mM MgSO_4)。 (2) 电泳液 0.1N pH7.8 三乙胺-碳酸盐缓冲液。 (3) A 闪烁液 0.5% TP-0.03% POPOP 的二甲苯溶液, B 闪烁液: 0.5% PPO-0.03% POPOP 的二甲苯与 TritonX-100 溶液。

3. 方法 (1) $^3\text{H-cAMP}$, $^3\text{H-cGMP}$ 的纯化 取 100 微居里 $^3\text{H-cAMP}$ 或 $^3\text{H-cGMP}$ 滴在层析纸上 (8 × 100mm)。在其一旁滴入标准 cAMP 或 cGMP 作为荧光指示用。滤纸两端加 400V 电压, 电泳一小时后, 取出滤纸晾干, 在 2540 Å 荧光灯下观察荧光点位置, 剪下纯化的 $^3\text{H-cAMP}$ 或 $^3\text{H-cGMP}$ 所在位置的纸条, 浸泡在 B 缓冲液中洗脱, 洗脱液的放射性浓度调整到 20 微居里/ml, 此溶液 4℃ 冰箱存放一至二周仍可使用。

(2) 环核苷酸磷酸二酯酶的制备 大鼠断头, 迅速取出大脑, 用 A 缓冲液洗去血迹, 投入液氮, 收集十只大脑并加入三倍量 A 缓冲液, 用高速组织捣碎器捣碎, 并制成匀浆 (4℃), 低温 13000 r. pm 离心 20 分钟, 上清液用 50% 饱和度的硫酸铵沉淀蛋白。沉淀经透析, 即得部分提纯的 PDE 制剂, 产品分装, -20℃ 储存 4 个

月酶活力不见下降,但5倍稀释酶液在4℃放一周,酶活力约下降20%。用Lowry法测定酶蛋白含量。

(3) 磷酸二酯酶活力测定 ① 纸电泳法在0.2ml B缓冲液中含1.0微居里³H-cAMP和磷酸二酯酶蛋白(以水解40%³H-cAMP为最适量),30℃保温15分钟后,立即在沸水浴中煮2分钟,终止反应。精确取0.05ml反应液滴在层析滤纸上,同时滴入标准cAMP,5'-AMP,腺苷混合液作为荧光指示用,电泳点大小控制在直径8×12毫米范围内。滤纸两端加400V电压,电泳一小时,电泳完毕,滤纸在红外灯下烘10分钟,干后在2540Å荧光灯下观察荧光点位置,以每个荧光点为中心,剪下直径2.5厘米的圆纸片,投入A闪烁液中,测其放射性,并按下式计算它的水解率:

$$H\% = \frac{C_s - C_B}{C_t - C_B} \times 100\%$$

此处的 C_s 为酶水解产物³H-5'-AMP和³H-腺苷的计数率。 C_B 为无酶时空白管的³H-5'-AMP和³H-腺苷的计数率。 C_t 为每个管的总计数率即³H-cAMP、³H-5'-AMP和³H-腺苷总计数率。

② 阴离子交换树脂过柱法 参照文献[2]。在0.2ml(B)缓冲液中含1.0微居里³H-AMP和PDE蛋白(以水解40%³H-cAMP为最适量),30℃保温15分钟后沸水浴煮2分钟,终止反应,冷却至室温后,加10微升蛇毒(10mg/ml),继续在30℃保温15分钟,立即置沸水浴煮2分钟,终止反应后加入1μM腺苷作载体,全部反应液过Dowex1-xa₂柱(氯型),用蒸馏水洗脱,收集前5毫升,取其中1毫升加10毫升B闪烁液测其放射性。

二、结果与讨论

1. 磷酸二酯酶浓度的选择 当底物浓度一定时,底物的水解率随磷酸二酯酶的浓度而变化,酶的浓度最好选在直线变化范围内,由图1表明,在本实验条件下,鼠脑的cGMP磷酸二酯酶蛋白量在1.10—2.30微克范围内对cGMP的

水解率是线性的,故本实验cGMP—PDE蛋白量选在1.5—1.8微克之间,而cAMP—PDE蛋白量选在3.0—3.5微克之间。

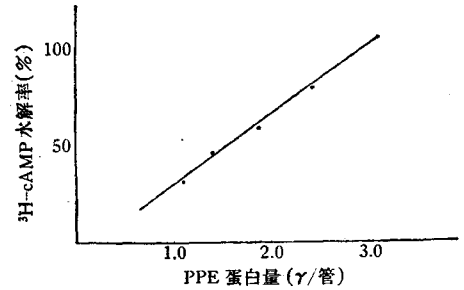


图1 PDE蛋白量-水解率关系图

2. ³H-cAMP及其水解产物放射性层析

图³H-cAMP被PDE水解后的反应液,经电泳分离(图2),³H-AMP在最前面,³H-cAMP居中,³H-腺苷在终点附近。它们相对位置的距离,可以采用适当的电泳时间将它们彼此拉开,在本实验条件下电泳1小时是足够了。电泳后,非标记物的荧光位置和标记物的放射性峰位是完全重叠的,所以可以根据荧光位置确定

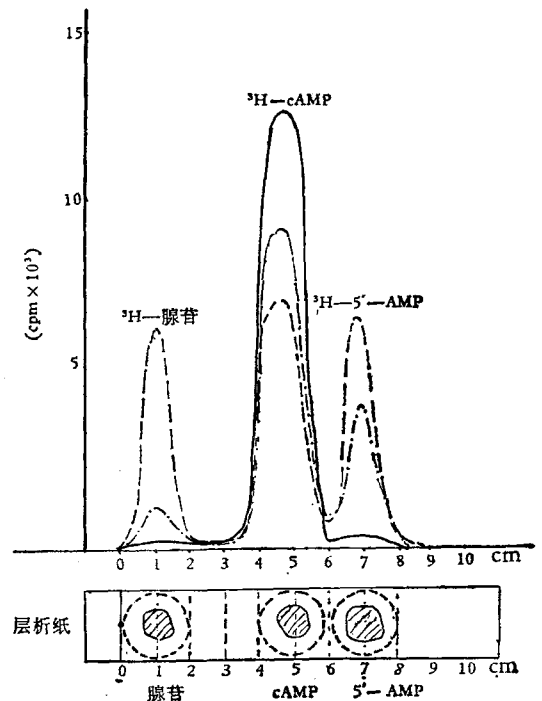


图2 PDE水解³H-cAMP的放射层析图

——无 PDE; - - - - PDE + 抑制剂;
- · - · 有 PDE

放射性所在。另外部分纯化的 PDE 制剂中除 PDE 活性外还含有 5'-核苷酸酶的活性,所以采用一步水解法时它的水解产物除 ^3H -5'-AMP 的放射性外,还应该包括 ^3H -腺苷的放射性。

3. 纸电泳分离法稳定性的观察 用六个样品,每个样品重复四次滴样,电泳分离后对水解产物进行放射性测量,观察其稳定性,结果列于表 1。由此可见,样品的变异系数最低 4.0%,最高 9.4%,平均为 5.7%,因此,该法稳定性是良好的。

表 1 纸电泳分离法的稳定性

样品	实验次数 (n)	均值 $\pm$ S. D	C. V (%)
1	4	23841 $\pm$ 1512.5	6.3
2	4	14520 $\pm$ 586	4.0
3	4	22296 $\pm$ 1106	4.9
4	4	20923 $\pm$ 945	4.5
5	4	18973 $\pm$ 1774	9.4
6	4	19566 $\pm$ 916	4.6

4. 纸电泳法和阴离子交换法的比较 阴离子交换法分离水解产物,必须经过二步水解反应,而纸电泳分离法分离水解产物既适用于二步水解产物分离,亦适用于一步水解产物的分

表 2 纸电泳分离法和离子交换法比较

黄芩浓度 (r/ml)	一步水解抑制率 (%)	二步水解抑制率 (%)	
	纸电泳法	纸电泳法	离子交换法
60.0	61.3	62.6	62.9
50.0	53.9	57.5	56.7
25.0	30.0	35.5	35.0

离。以黄芩总黄酮对 PDE 抑制作用为例,来考察两种分离方法,所得结果列于表 2、图 3。由

图 3 浓度-抑制率曲线求得一步水解纸电泳法的 $I_{50} = 47\text{r/ml}$,二步水解纸电泳法的 $I_{50} = 43\text{r/ml}$,二步水解离子交换法的 $I_{50} = 42\text{r/ml}$ 。这说明两种方法所得结果只相差 1%。

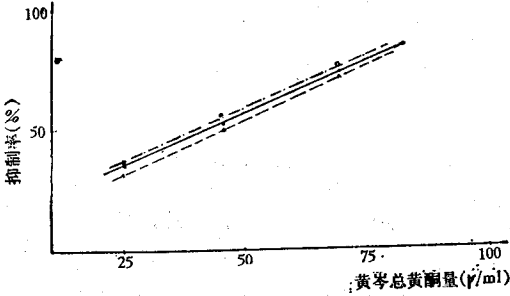


图 3 黄芩总黄酮对 PDE 抑制曲线
(——) 一步水解电泳法
(---) 二步水解离子交换法
(——) 二步水解电泳法

由此可见用纸电泳分离 PDE 水解产物的方法测定 PDE 的活性,方法的稳定性是良好的,所得结果和离子交换法非常接近。另外,纸电泳法还有二个突出的优点:(1)不采用蛇毒,可以对一步水解产物进行分离。(2)放射性测量采用纸片法比采用大量水样的均相测量法要省费用和省人力,因此是得推广。

参 考 文 献

[1] Butcher, R. W. et al.: *J. Biol. Chem.*, **237**, 1244, 1962.
[2] Thompson, W. J. et al.: *Biochemistry*, **10**, 311, 1971.
[3] Loten, E. G. et al.: *Biochem.*, **76**, 187, 1970.
[4] Omg, K. K. et al.: *Analytical Biochem.*, **76**, 53, 1976.

[本文于 1981 年 7 月 1 日收到]

学术动态

第七届国际生物物理学会召开

此会于 1981 年 8 月在墨西哥的墨西哥城召开的。参加人数达一千一百余,来自四十二个国家与地区。在美国学习的中国学者 8 人也参加了会议。
会议讨论的问题有:生物大分子内的运动;肌肉中力驱动分子间相互作用;膜中分子间相互作用动力

学;电化势的发生与利用的分子事件;酶作用生物物理;毒物及其受体的分子结构及作用规律;光合作用原初事件;神经元间的通讯;碳水化合物与糖蛋白的结构与功能;光感受器与听觉感受器生物物理;表皮的转运
(下转第 52 页)